

Isolasi, seleksi, dan identifikasi bakteri selulolitik dari rumput laut Turbinaria sp. (Mulyasari)

ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOLITIK DARI RUMPUT LAUT *Turbinaria* sp. DAN *Sargassum* sp. SEBAGAI KANDIDAT PENDEGRADASI SERAT KASAR PAKAN IKAN

Mulyasari[#], Irma Melati, dan Mas Tri Djoko Sunarno

Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar

(Naskah diterima: 11 Juni 2014; Revisi final: 26 Februari 2015; Disetujui publikasi: 11 Maret 2015)

ABSTRAK

Kecernaan karbohidrat oleh ikan dapat ditingkatkan antara lain melalui penambahan bakteri selulolitik dalam pakan. Salah satu sumber bakteri selulolitik adalah rumput laut. Oleh karena itu, suatu penelitian dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan bakteri selulolitik dari rumput laut *Turbinaria* sp. dan *Sargassum* sp. Bakteri selulolitik diisolasi dengan metode pengenceran, *streaking* dan *spreading* pada media *carboxymethylcellulose* (CMC). Koloni yang didapat dimurnikan dan diseleksi dengan menggunakan uji aktivitas enzim selulase secara kualitatif (zona bening) dan kuantitatif, serta diidentifikasi secara biokimia dan molekuler menggunakan gen 16S-rRNA. Pada penelitian ini diperoleh 22 isolat murni bakteri dengan dua isolat yang mempunyai aktivitas selulolitik tertinggi, yaitu TS2b dan SS4b. Hasil uji biokimia dan karakterisasi secara molekuler menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut adalah *Bacillus subtilis* dan *B. megaterium*.

KATA KUNCI: bakteri selulolitik, rumput laut, 16s-rRNA

ABSTRACT: *Isolation, selection and identification of cellulolytic bacteria from seaweed as a candidate of crude fibre degradation. By: Mulyasari, Irma Melati, and Mas Tri Djoko Sunarno*

Digestibility of carbohydrate of fish can be improved through adding cellulolytic bacteria in the diet. One source of cellulolytic bacteria is seaweed. An experiment in propose of isolating, selecting, and identifying cellulolytic bacteria from Turbinaria sp. and Sargassum sp., therefore, was conducted. Cellulolytic bacteria were isolated from seaweed using dilution methods, streaking and spreading on media of carboxymethylcellulose (CMC). Colonies obtained were purified and selected using enzyme cellulase activity test qualitatively (clear zone) and quantitative as well and then identified by biochemistry and molecular using 16S-rRNA gene. The results show that there were 22 pure bacterial isolates at which two of them had the highest cellulolytic activity, namely bacterial codes of TS2b and code SS4b. Based on biochemistry test and molecular identification, bacterial species of code TS2b and SS4b was Bacillus subtilis and B. megaterium, respectively.

KEYWORDS: cellulolytic bacteria, seaweed, 16s-rRNA

PENDAHULUAN

Mikroorganisme selulolitik menghasilkan seperangkat enzim yang dapat menghidrolisis selulosa kristal secara sinergis menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya menjadi glukosa yang dapat digunakan oleh mikroorganisme tersebut sebagai sumber hara bagi pertumbuhannya. Proses hidrolisis berlangsung jika terjadi kontak antara sel bakteri dan permukaan selulosa (Ilmen *et al.*, 1997; Busto *et al.*, 1995). Isolasi bakteri penghasil selulase sangat penting untuk di-

lakukan, mengingat besarnya potensi selulase pada berbagai industri termasuk industri akuakultur. Bhat (2000) menyatakan bahwa enzim selulase banyak dimanfaatkan dalam industri makanan, minuman, *pulp*, dan kertas, tekstil, detergen, pakan ternak, dan pertanian. Isolasi bakteri penghasil selulase dari berbagai sumber telah dilakukan antara lain dari lambung sapi (Bai *et al.*, 2012), kompos pertanian (Baharuddin *et al.*, 2010), sumber air panas (Aminin *et al.*, 2007), ekosistem air hitam (Fikrinda, 2000), dan tanah (Lednicka *et al.*, 2000). Salah satu sumber bakteri selulolitik yang dapat dimanfaatkan pada sektor perikanan berasal dari rumput laut.

Industri alginat dari rumput laut *Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp. menghasilkan limbah serat kasar khu-

[#] Korespondensi: Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar. Jl. Raya Sempur No. 1, Bogor 16154, Indonesia. Tel.: + (0251) 8313200
E-mail: mulyasari_bogor@yahoo.co.id

susnya selulosa yang sulit larut dalam air yang dapat menyebabkan pencemaran lingkungan. Menurut Kim *et al.* (2008), industri rumput laut menghasilkan limbah sekitar 65%-70% dari bahan baku segar. Salah satu alternatif solusi masalah tersebut adalah memanfaatkan limbah rumput laut tersebut sebagai bahan baku pakan ikan. Pemanfaatan limbah rumput laut sebagai bahan baku pakan ikan sangat terbatas, karena tingginya kadar serat kasar khususnya selulosa dan rendahnya kandungan protein kasar.

Serat kasar merupakan salah satu komponen polisakarida non-pati. Kandungan polisakarida non-pati dalam pakan (terutama selulosa) tidak boleh terlalu tinggi karena sulit dicerna, khususnya untuk ikan karnivora yang tidak mempunyai mikroorganisme penghasil enzim selulase yang dapat memecah ikatan glikosidik β 1.4 pada selulosa. Menurut Leeson & Zubair (2000), selulosa akan memengaruhi viskositas cairan usus yang berakibat terhadap penurunan kecepatan difusi substrat dan enzim pencernaan, sehingga menurunkan efisiensi penyerapan nutrisi secara keseluruhan pada dinding usus, yang selanjutnya akan berdampak langsung terhadap penurunan efisiensi pakan dan performa pertumbuhan ikan.

Salah satu upaya untuk memanfaatkan limbah industri rumput laut tersebut adalah dengan mengolahnya menjadi bahan pakan ikan melalui proses degradasi selulosa oleh bakteri. Sumber bakteri yang mampu mendegradasi selulosa tersebut adalah bakteri yang berasal dari rumput laut itu sendiri mengingat rumput laut mengandung selulosa yang cukup tinggi (15%-25%) (Kim *et al.*, 2008). Bakteri tersebut dapat mempertahankan hidupnya dengan menjadikan selulosa sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhannya sehingga diduga bakteri tersebut mempunyai enzim selulase untuk mendegradasi selulosa. Oleh karena itu, suatu percobaan telah dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan bakteri selulolitik dari *Turbinaria* sp. dan *Sargassum* sp. dengan mengisolasi, menyeleksi, serta mengidentifikasi bakteri yang didapatkan.

BAHAN DAN METODE

Isolasi Bakteri

Jenis rumput laut yang digunakan adalah *Turbinaria* sp. dan *Sargassum* sp. yang diperoleh dari Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Pengambilan sampel bakteri dari rumput laut dilakukan dengan cara menginkubasinya selama tujuh hari pada suhu kamar. Rumput laut hasil inkubasi digerus dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex dan dijadikan sebagai sumber inokulum. Selanjutnya, 1 mL sumber inokulum diencerkan dalam 14 tabung pengenceran yang masing-masing berisi 9 mL larutan fisiologis dan dihomogenkan. Dari setiap tabung pengencer diambil

larutan sebanyak 0,1 mL; dan disebarkan dalam cawan petri berisi agar *carboxymethylcellulose* (CMC). Kultur dalam agar CMC dibuat secara duplo.

Isolasi bakteri selulolitik dilakukan dengan metode cawan sebar pada media CMC 1% (1 gCMC; 0,02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,075 g KNO_3 ; 0,05 g K_2HPO_4 ; 0,002 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,004 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g ekstrak kamir; 1,5 g agar-agar bakto, dan 0,1 g glukosa). Koloni bakteri yang tumbuh diidentifikasi berdasarkan perbedaan warna, bentuk, dan ukurannya. Setiap jenis koloni yang didapat dimurnikan dengan metode penggoresan kuadran, sampai didapatkan koloni bakteri yang tunggal dan seragam untuk selanjutnya diseleksi secara kualitatif maupun kuantitatif.

Seleksi Bakteri Selulolitik secara Kualitatif

Uji kualitatif (zona bening) menggunakan metode pewarnaan *congo red* 0,1% dan iodine 1%. Isolat mikroba selulolitik ditotolkan pada media agar CMC. Bakteri diinkubasi selama tiga hari pada suhu 37°C dan kemudian dilakukan uji aktivitas bakteri dengan menambahkan *congo red* 0,1% sebanyak 15 mL dan didiamkan selama 30-60 menit. Setelah itu, dibilas sebanyak 2-3 kali dengan 15 mL NaCl 1 M dan didiamkan selama 15 menit.

Selain menggunakan *congo red* dalam percobaan ini juga dilakukan uji aktivitas bakteri dengan menggunakan iodine (Andriani *et al.*, 2012). Diameter zona bening dan diameter koloni yang terbentuk diukur. Uji aktivitas selulase dilihat dari indeks selulase yang terbentuk. Indeks selulase merupakan nisbah antara zona bening dengan diameter koloni. Semakin besar indeks selulolitik yang dihasilkan maka semakin besar enzim yang dihasilkan oleh isolat bakteri tersebut. Indeks selulolitik atau indeks aktivitas selulase (IAS) diperoleh dengan menggunakan rumus berikut (Kader & Omar, 1998):

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{\text{DB} - \text{DK}}{\text{DK}}$$

di mana:

DB = Diameter zona bening (mm)

DK = Diameter koloni (mm)

Seleksi Bakteri Selulolitik Secara Kuantitatif

Peremajaan isolat dilakukan pada media agar CMC 1% (b/v) pada suhu ruang hingga berumur 24 jam dan disimpan dalam refrigerator pada suhu 4°C. Masing-masing sebanyak dua lup isolat 24 jam diinokulasikan ke dalam 100 mL media CMC 1% cair dan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam. Enzim selulase ekstrak kasar didapat dengan melakukan sedimentasi hasil kultur pada kecepatan 9.000 x g selama sepuluh menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan kemudian

diuji aktivitas enzimnya dengan menggunakan metode Miller (1959) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 1,8 mL substrat (CMC 1%) yang dilarutkan dalam 0,1 M buffer sitrat fosfat pH 5, kemudian ditambah dengan 0,2 mL enzim selulase, dikocok kuat dengan vortex, dan selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C, dan reaksi enzim dihentikan dengan pendidihan pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah itu, diambil sebanyak 1 mL dari campuran reaksi dan ditambah dengan 1 mL DNS, dididihkan pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah larutan dingin, absorbansi diukur pada λ 550 nm. Perlakuan kontrol dan blanko dilakukan secara bersamaan dengan metode dan tahapan yang sama. Pada kontrol, enzim yang akan direaksikan dengan substrat telah diinaktivasi terlebih dahulu dengan memanaskan enzim selama 15 menit dalam air mendidih. Pada blanko, larutan enzim diganti dengan larutan buffer sitrat fosfat pH 5. Aktivitas selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/mL. Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk memecah selulosa menghasilkan 1 μ mol glukosa (gula pereduksi) dalam satu menit. Kadar glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa dengan enzim selulase dihitung berdasarkan nilai absorbansi pada λ 550 nm dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Absorbansi} = (A_s - A_b) - (A_k - A_b)$$

di mana:

A_s = Absorbansi sampel

A_b = Absorbansi blanko

A_k = Absorbansi kontrol

Nilai absorbansi yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam persamaan yang diperoleh dari kurva standar glukosa. Aktivitas selulase dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Irawan *et al.*, 2008 dalam Rahmadini, 2012):

$$\text{Aktivitas selulase (U/mL)} = \frac{KG \times 1.000}{V \times t \times BM}$$

di mana:

KG = Kadar glukosa (mg/L)

V = Volume enzim (0,2 mL)

t = Waktu inkubasi (30 menit)

BM = Bobot molekul glukosa (180 Dalton)

Identifikasi Bakteri Selulolitik Terpilih

Bakteri yang mempunyai aktivitas tertinggi kemudian diidentifikasi menggunakan metode uji biokimia standar dan identifikasi secara molekuler (sekuensing). Uji biokimia standar diawali dengan pewarnaan Gram untuk mendeteksi morfologi awal dari bakteri. Kunci determinasi yang digunakan merujuk pada kunci determinasi *Bergey's Determinative Bacteri-*

ology dengan melakukan serangkaian uji morfologi dan biokimia, yaitu bentuk bakteri, uji pewarnaan Gram, uji katalase, uji oksidatif/fermentatif (OF), spora, dan motilitas.

Identifikasi isolat bakteri secara molekuler dilakukan berdasarkan sekuen gen penyandi 16S-rRNA (Suwanto *et al.*, 2000). Identifikasi isolat dilakukan dengan menentukan sekuen gen penyandi 16S rRNA melalui PCR dan membandingkan dengan data sekuen yang tersedia di *Gene Bank*. Tahap-tahap analisis isolasi bakteri secara molekuler meliputi: (a) isolasi DNA total, (b) amplifikasi gen penyandi 16S-rRNA dengan PCR, (c) verifikasi dengan elektroforesis gel agarosa, (d) *cycle sequencing*, dan (e) *sequencing* hasil PCR. Data hasil sekuensing yang didapat kemudian diterjemahkan menggunakan program bioedit dan hasilnya dicocokkan dengan data di gen bank dengan mengakses <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

HASIL DAN BAHASAN

Isolasi dan Seleksi Mikroba Selulolitik dari *Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp.

Hasil isolasi mikroba dari *Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp. diperoleh 22 isolat yang memiliki kemampuan untuk tumbuh dalam media yang mengandung CMC, yaitu suatu polisakarida yang berfungsi sebagai indikator selulosa. Ciri morfologi dari koloni ke-22 isolat tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan uji kualitatif enzim selulolitik menggunakan metode pewarnaan iodine 1%, dari 22 isolat tersebut diperoleh tujuh isolat yang positif menghasilkan zona bening, yaitu: isolat SS1a, SS3a, SS4a, SS4b, SS4c, TS1c, dan TS2b. Sedangkan berdasarkan metode pewarnaan *congo red* 0,1% hanya diperoleh satu isolat bakteri yang menghasilkan zona bening yaitu isolat TS2b. Besar zona bening yang terbentuk dan indeks selulolitik dari masing-masing isolat disajikan pada Tabel 2.

Indeks selulolitik tertinggi didapatkan pada bakteri SS4b, yaitu sebesar 2,5 dan TS2b yaitu sebesar 2,71 dan 4. Indeks selulolitik ini menunjukkan kemampuan isolat tersebut dalam mendegradasi selulosa. Gambar zona bening dari isolat SS4b dan TS2b disajikan pada Gambar 1.

Hasil uji aktivitas enzim secara kuantitatif menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulolitik tertinggi adalah pada isolat TS2b yaitu sebesar 0,0099 U/mL (Tabel 3). Hal ini sejalan dengan uji kualitatif menggunakan metode zona bening di mana isolat TS2b memberikan zona bening paling tinggi dibandingkan isolat lainnya. Ketujuh isolat bakteri asal rumput laut yang menghasilkan zona bening, kemudian diiden-

Tabel 1. Morfologi bakteri dari *Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp. yang tumbuh pada media CMC 1%
 Table 1. The morphology of bacteria from *Sargassum* sp. and *Turbinaria* sp. growing on CMC 1%

Asal isolat <i>Isolate origin</i>	Kode <i>Code</i>	Morfologi (<i>Morphology</i>)
<i>Sargassum</i> sp.	SS1a	Krem, bulat sedang, berinti besar (<i>Beige, moderate circular, large core colony</i>)
	SS1b	Krem, bulat sedang, berinti kecil (<i>Beige, moderate circular, small core colony</i>)
	SS1c	Krem, bulat kecil, tebal (<i>Beige, small circular, thick colony</i>)
	SS1d	Krem, bulat besar, tidak berinti (<i>Beige, large circular, no core colony</i>)
	SS1e	Krem, bulat sedang berinti kecil (<i>Beige, moderate circular, small core colony</i>)
	SS2a	Krem kecoklat-coklatan, bulat kecil (<i>Brownish beige, small circular colony</i>)
	SS2b	Krem kecoklat-coklatan, bulat besar (<i>Brownish beige, large circular colony</i>)
	SS3a	Putih, besar, berserabut (<i>White, large, fibrous colony</i>)
	SS3b	Putih, kecil, berserabut (<i>White, small, fibrous colony</i>)
	SS4a	Putih, tebal, pinggiran berserabut (<i>White, fibrous, thick colony</i>)
	SS4b	Putih, transparan, berserabut (<i>White, transparent, fibrous colony</i>)
	SS4c	Kuning kehijau-hijauan transparan, tidak berserabut, mengkilap <i>Greenish yellow, transparent, non fibrous, shiny colony</i>
<i>Turbinaria</i> sp.	TS1a	Putih, bulat besar (<i>White, large circular colony</i>)
	TS1b	Putih kecoklat-coklatan, bulat sedang <i>Brownish white, moderate circular colony</i>
	TS1c	Kuning kehijauan, bulat transparan, tidak berinti <i>Greenish yellow, transparency circular, no core colony</i>
	TS2a	Putih, bulat besar (<i>White, large circular colony</i>)
	TS2b	Putih, bulat sedang (<i>White, moderate circular colony</i>)
	TS2c	Putih, bulat kecil (<i>White, small circular colony</i>)
	TS2d	Putih, bulat sangat kecil (<i>White, very small circular colony</i>)
	TS3a	Putih kehijauan, transparan, bulat besar <i>Greenish white, transparent, large circular colony</i>
	TS3b	Putih kehijauan (lebih kuning), transparan, bulat kecil <i>Greenish white (tend to yellow), transparent, small circular colony</i>
	TS3c	Putih, bulat sedang (<i>White, moderate circular colony</i>)

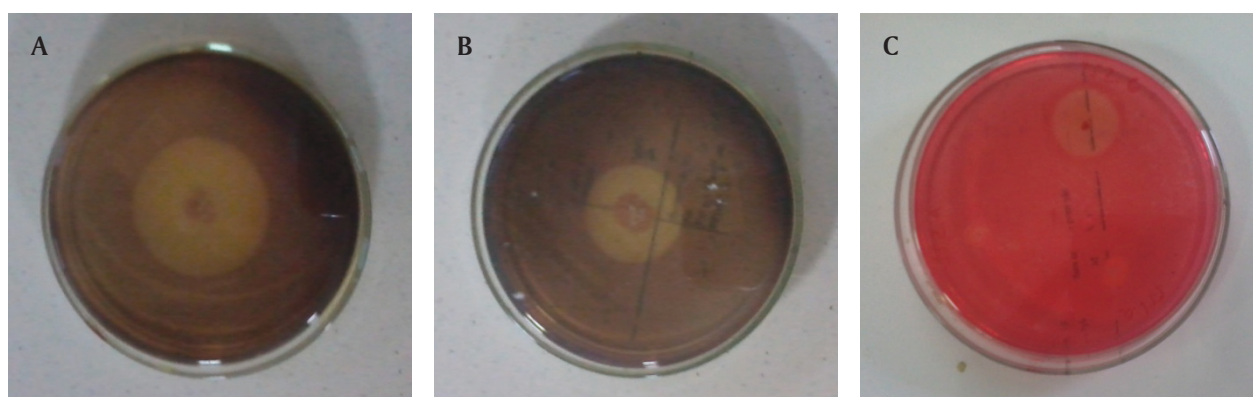
Tabel 2. Aktivitas selulolitik (zona bening) dan indeks selulolitik hasil hidrolisis CMC 1% dari bakteri asal *Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp.

Table 2. Cellulolytic activity (clear zone) and cellulolytic index of bacteria that isolated from *Sargassum* sp. and *Turbinaria* sp.

Asal isolat <i>Isolate origin</i>	Kode <i>Code</i>	Aktivitas selulolitik (zona bening) <i>Celullotic activity (clear zone)</i>	Indeks selulolitik <i>Celullolytic index</i>
<i>Sargassum</i> sp.	SS1a	++ [*]	1.0
	SS3a	+ [*]	0.4
	SS4a	++++ [*]	1.5
	SS4b	+++++ [*]	2.5
	SS4c	+++ [*]	1.5
<i>Turbinaria</i> sp.	TS1c	+++++ [*]	2.5
	TS2b	+++++ ^{*®}	2.7 [*] / 4 [®]

Keterangan (*Remarks*):

+ = Sedikit atau banyak (*Few or more*); * = Uji pewarnaan iodin (*Iodin staining test*); ® = Uji pewarnaan congo red (*Congo red staining test*)



Gambar 1. Zona bening hasil hidrolisis CMC 1%. Isolat TS2b (pewarnaan iodine) (A), isolat SS4b (pewarnaan iodine) (B), dan isolat TS2b (pewarnaan congo red) (C)

Figure 1. Clear zone that formed from CMC 1% hydrolysis. Isolate TS2b (iodine staining) (A), isolate SS4b (iodine staining) (B), and isolate TS2b (congo red staining) (C)

Tabel 3. Aktivitas enzim selulase (kuantitatif) dari isolat bakteri asal *Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp.

Table 3. Cellulase enzyme activity (quantitative) of bacteria that isolated from *Sargassum* sp. and *Turbinaria* sp.

Isolat bakteri <i>Bacteria isolate</i>	Aktivitas enzim <i>Enzyme activity (U/mL)</i>
SS1a	0.0031
SS3a	0.0021
SS4a	0.0017
SS4b	0.0037
SS4c	0.0029
TS1c	0.0043
TS2b	0.0099

identifikasi secara morfologi dan biokimia dan hasilnya disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 2.

Isolat bakteri TS2b dan SS4b memiliki aktivitas enzim selulolitik tertinggi dibandingkan isolat lain yang dikarakterisasi secara molekuler (sekuensing) untuk mengetahui spesies bakteri tersebut. Proses amplifikasi gen 16S-rRNA menggunakan dua primer universal spesifik untuk bakteri, yaitu 63f (5'-CAGGCTAACACAGGCAAGTC) dan 1387r (5'-GGGCGG WGTGTACAAGGC) (Marchesi *et al.*, 1998). Penentuan primer sangat menentukan keberhasilan reaksi PCR, karena primer inilah yang akan menentukan daerah genom yang akan diamplifikasi (Rafsanjani, 2011). Hasil amplifikasi gen 16S-rRNA dapat dilihat pada Gambar 3. Tampak bahwa pita amplikon berada pada ukuran 1.500 bp. Kemudian setelah tahapan ini dilanjutkan dengan sekuensing. Hasil analisis sekuens parsial DNA penyandi 16S-rRNA isolat TS2b sebanyak 1.275 pasang basa dari arah 5'-3' (Gambar 4).

Hasil sekuensing yang diperoleh berupa data mentah yang harus diolah menggunakan program bioedit. Data yang diperoleh dari hasil program bioedit kemudian dimasukkan ke dalam program NCBI BLAST sehingga diketahui jenis bakteri yang kita dapat. Hasil dari pembacaan pada program BLAST dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5 menunjukkan bahwa sampel mempunyai tingkat homologi yang tinggi yaitu 96%-99% dengan data yang ada di *Gene Bank* berdasar pada urutan sekuens DNA. Tingkat kesamaan nukleotida sekitar 80% termasuk ke dalam tingkat kesamaan yang tinggi (Addinilia, 2012). Teknik amplifikasi 16S-rRNA merupakan teknik yang akurat, lebih sensitif, murah, dan cepat dibandingkan dengan teknik identifikasi secara konvensional seperti morfologi, biokimia atau serologi tes. Identifikasi secara konvensional bisa menyebabkan spesies mempunyai kemiripan dalam fisiologi dan rentan terhadap perubahan lingkungan (Macrae, 2000).

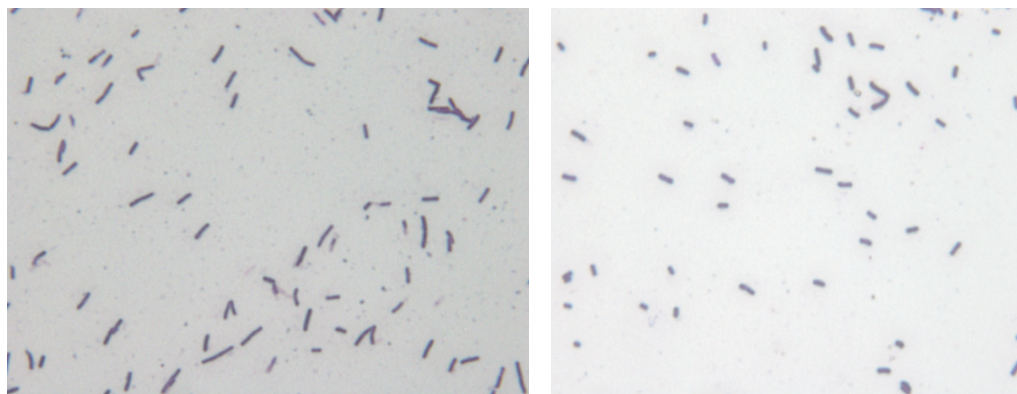
Selulase merupakan enzim yang banyak diaplikasikan pada berbagai industri seperti tekstil, laundry, pulp dan kertas, ekstraksi jus buah, dan aditif pada makanan sampai produksi bioetanol (Bhat, 2000). Selulase mempunyai potensi yang cukup besar dalam proses sakarifikasi lignoselulosa menjadi gula yang dapat digunakan untuk produksi bioetanol, asam laktat, dan *Single Cell Protein* (Maki *et al.*, 2009). Kebanyakan penelitian tentang produksi selulase difokuskan pada jenis fungi dan hanya sedikit yang meneliti pada bakteri (Bhat, 2000). Dibandingkan fungi, produksi selulase pada bakteri adalah lebih sedikit, tetapi enzim pada bakteri dapat dihasilkan lebih cepat dan dapat direkayasa secara genetik untuk meningkatkan produksinya (Ponnambalam *et al.*, 2011). Salah satu bakteri yang bisa menghasilkan enzim selulase adalah *Bacillus* (Robson & Chambliss, 1989).

Tabel 4. Hasil identifikasi biokimia isolat bakteri selulolitik asal *Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp.Table 4. Biochemical identification of cellulolytic bacteria from *Sargassum* sp. and *Turbinaria* sp.

Jenis uji Test type	Kode bakteri (Bacteria code)						
	SS1a	SS3a	SS4a	SS4b	SS4c	TS1c	TS2b
Gram	+	+	-	+	+	-	+
Bentuk (Shape) *	A	B	C	D	E	F	G
Katalase (Catalase)	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase (Oxidase)	+	+	+	-	+	+	-
Motilitas (Motility)	-	-	-	-	-	+	-
Spora (Spore)	+	+	+	+	+	+	+

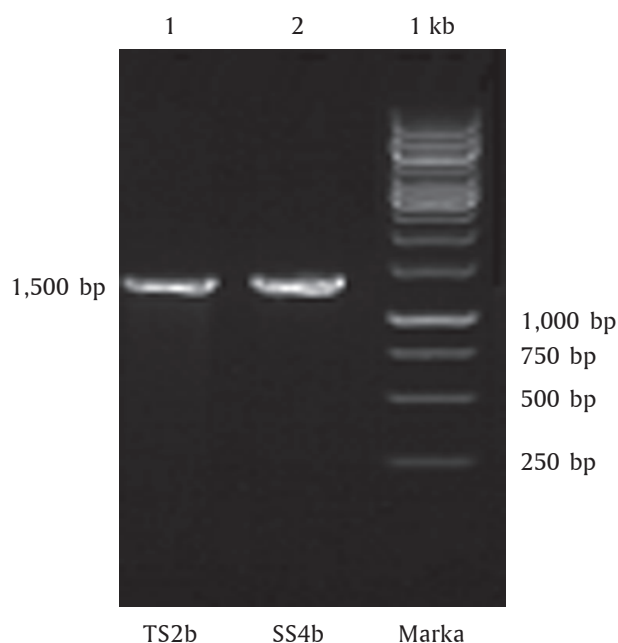
Keterangan (Remarks):

* A = Batang rantai pendek (*Bacil short chain*); B = Batang rantai panjang (*Bacil long chain*); C = Batang kecil rantai tunggal (*Small bacil single chain*); D = Batang kecil rantai pendek (*Small bacil short chain*); E = Batang rantai panjang (*Bacil long chain*); F = Batang sangat kecil rantai tunggal (*Very small bacil single chain*); G = Batang rantai pendek (*Bacil short chain*)



Gambar 2. Morfologi isolat TS2b (kiri) dan SS4b (kanan) (pembesaran 1.000x)

Figure 2. Morphology of isolates TS2b (left) and SS4b (right) (magnificent 1,000x)

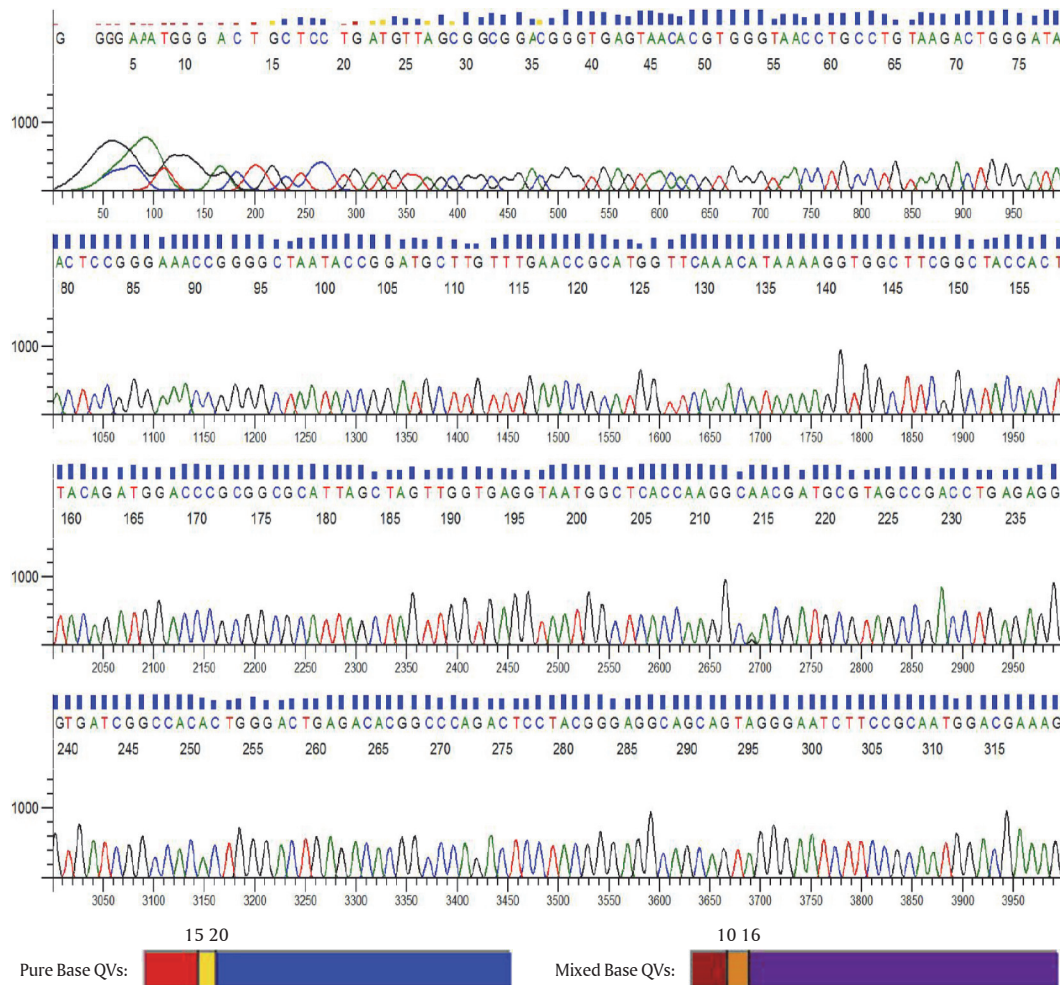


Gambar 3. Hasil amplifikasi gen 16S-rRNA

Figure 3. Amplification product of 16S-rRNA gene

Menurut Deka *et al.* (2011), *Bacillus* sp. merupakan bakteri yang banyak dimanfaatkan dalam bidang industri karena kemampuannya yang tinggi dalam produksi dan pengeluaran enzim ekstraseluler dalam jumlah yang besar. *Bacillus* spp. sangat potensial untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi karena mempunyai sifat-sifat seperti memiliki kisaran suhu pertumbuhan yang luas, pembentuk spora, kosmopolit, tahan terhadap senyawa-senyawa antiseptik, bersifat aerob atau fakultatif anaerob, memiliki kemampuan enzimatik yang beragam, dan beberapa di antaranya mampu melakukan biodegradasi terhadap banyak senyawa xenobiotik, serta tidak membutuhkan faktor tumbuh yang mahal. *Bacillus* sp. terdiri atas beberapa jenis dan tersebar luas di berbagai habitat. Jenis *Bacillus* sp. yang sudah dikenal di dunia industri di antaranya adalah *Bacillus subtilis* dan *B. megaterium*.

B. subtilis merupakan bakteri Gram positif dengan katalase positif (Madigan & Martinko, 2005). Bakteri ini berbentuk batang, mempunyai kemampuan membentuk endospora pelindung, sehingga me-



Gambar 4. Sebagian sekuen DNA penyandi 16S-rRNA isolat TS2b

Figure 4. Part of the DNA sequence coding for 16S-rRNA isolates TS2b

Tabel 5. Hasil BLAST dari bakteri selulolitik terpilih
Table 5. BLAST results of selected cellulolytic bacteria

Kode sampel Sample code	Cakupan Query coverage (%)	Deskripsi Description
TS2b	99	<i>Bacillus subtilis</i>
SS4b	96	<i>B. megaterium</i>

mungkinkan bakteri ini dapat bertahan pada kondisi ekstrim (Nakano *et al.*, 1998). *B. subtilis* ditemukan dalam tanah dan saluran pencernaan manusia. *B. subtilis* dilaporkan mempunyai aktivitas degradasi selulosa yang tinggi (Mawadza *et al.*, 1996). *B. subtilis* strain AU-1 dapat menghasilkan *carboxymethylcellulase* (CMCase) dan *avilase* pada media yang mengandung berbagai karbohidrat sebagai sumber utama karbon untuk kehidupannya (Chan & Au, 1987). Hal senada diungkapkan oleh Cantarel *et al.* (2009), *B. subtilis* bisa memanfaatkan mono-, di-, dan oligosakarida, gula amino dan turunan N-asetil, asam glikonik dan gli-kuronik, dan gula turunan polialkohol. Strain *B. subtilis*

AS3 mempunyai kemampuan untuk mendegradasi substrat selulosa seperti sekam padi, ampas tebu, dan rumput liar (Deka *et al.*, 2011).

Selulase *B. subtilis* dapat diproduksi pada medium yang murah seperti molase (Shabeb *et al.*, 2010). *B. subtilis* diketahui memiliki enzim pendegradasi polisakarida seperti α -amylase, pullulanase, endo- β -1,4-mannanase, levanase, glukon-1,4- α -maltotriase, pectate lyase, β -1,4-endoglukanase, β -1,3-1,4-endoglukanase, dan endo-1,4- β -xylanase. Enzim-enzim tersebut dapat memecah polisakarida ke dalam karbohidrat yang larut (Deutscher *et al.*, 2002). Narasimhan *et al.* (2013) melaporkan bahwa *B. subtilis* memiliki enzim kitinase dan β 1,3-Glukanase sehingga bakteri ini banyak digunakan sebagai agen biokontrol. *B. subtilis* sangat menarik digunakan dalam industri karena pertumbuhannya yang cepat, mampu mensekresikan protein ke dalam medium, dan pada umumnya aman digunakan (Schalmey *et al.*, 2004; Simonen & Palva, 1993). *B. subtilis* juga merupakan salah satu model mikroorganisme yang banyak digunakan dalam studi pengembangan biokimia, genetika, dan biologi

molekular (Barbe *et al.*, 2009; Kunst *et al.*, 1997). Hasil penelitian Manabe *et al.* (2013), mencatat terjadinya peningkatan produksi alkalin selulase pada *B. subtilis* strain MGB874 sampai sebesar 5,5 g/L melalui fermentasi NH₃-auksotat dan nilai ini merupakan jumlah tertinggi yang pernah dilaporkan.

B. subtilis merupakan inang yang sempurna untuk produksi berbagai macam protein sekretori (Yamane *et al.*, 2004). Banyak gen protein ekstraseluler dari bakteri yang akan digunakan untuk manusia dikloning dan diekspresikan pada *B. subtilis*. *B. subtilis* dapat digunakan untuk produksi beberapa selulase (Sukumaran *et al.*, 2005). Secara umum, dua metode yang dapat digunakan untuk mengekspresikan gen selulase di *B. subtilis* yaitu dari vektor atau kromosom (Schumann, 2007).

B. megaterium merupakan bakteri Gram positif bersifat aerobik dan mempunyai kemampuan membentuk spora. *B. megaterium* banyak ditemukan dalam tanah, air laut, sedimen, sawah, makanan kering, madu, susu, isi rumen sapi, serta limbah industri daging dan petrokimia (Andriani *et al.*, 2012; Scholle *et al.*, 2003). Nilai ekonomis penting dari bakteri ini adalah kemampuannya memproduksi vitamin B12 dan penisilin amidase, serta mengekspresikan protein asing tanpa degradasi dan penggunaannya dalam diagnostik AIDS (Vary, 1994 dalam Scholle *et al.*, 2003). *B. megaterium* mampu tumbuh pada berbagai sumber karbon dan dilaporkan mempunyai beberapa enzim ekstraseluler di antaranya enzim β -amilase, cyclodekstrin glukotransferase, dextranase, selulase, cellulase-free xylanase (Andriani *et al.*, 2012; Sindhu *et al.*, 2006; Priest, 1977). *B. megaterium* dosis 1% dapat menurunkan serat kasar kulit umbi sebesar 30,14% (Andriani *et al.*, 2012).

KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri dari rumput laut *Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp. diperoleh 22 isolat, di antaranya dua isolat menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu isolat TS2b dan SS4b. Kedua isolat tersebut adalah *Bacillus subtilis* dan *Bacillus megaterium*.

DAFTAR ACUAN

Addinilia, D. (2012). Analisis karakter genetik gen cytotome B pada sidat (*Anguilla bicolor* dan *A. marmorata*). Skripsi. Program Studi Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran Bandung.

Aminin, A.L.N., Madayanti, F., Aditiawati, P., & Akhmaloka. (2007). 16S Ribosomal RNA-Based Analysis of Thermophilic Bacteria in Gedongsongo Hot Spring. *Microbiology Indonesia*, 1(1), 37-42.

Andriani, Y., Sastrawibawa, S., Safitri, R., & Abun.

(2012). Isolasi dan identifikasi mikroba selulolitik sebagai biodegradator serat kasar dalam bahan pakan dari limbah pertanian. *IJAS2*, (3), 100-105.

Baharuddin, A.S., Razak, M.N.A., Hock, L.S., Ahmad, M.N., Aziz, S.A., Rahman N.A.A., & Shah, U.K.M. (2010). Isolation and characterization of thermophilic cellulase producing bacteria from empty fruit bunches-palm oil mill effluent compost. *American Journal of Applied Sciences*, 7, 56-62.

Bai, S., Kumar, R.M., Kumar, D.J., Mukesh, Balashanmugam, P., Kumaran, Bala, M.D., & Kalaichelvan, P.T. (2012). Cellulase production by *Bacillus subtilis* isolated from Cow Dung. *Applied Science Research*, 4(1), 269.

Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., & Medigue, C. (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology*, 155, 1758-1775.

Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355-383.

Busto, M.D., Ortega, N., & Perez-Mateos, M. (1995). Induction of β -glukosidase in fungal and soil bacterial cultures. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(7), 949-954.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 37, 233-238.

Chan, K.Y., & Au, K.S. (1987). Studies on cellulase production by *Bacillus subtilis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53(2), 125-136.

Deka, D., Bhargavi, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M., & Goyal, A. (2011). Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. *Research Article*. Indian Institut of Teknologi Guwahati. India, 8 pp.

Deutscher, J., Galinier, A., & Martin-Verstraetel. (2002). Carbohydrate uptake and metabolism. In Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., & Losick, R. (Eds.). *Bacillus subtilis and its closest relatives: from Genes to Cells*. Washington D.C. American Society for Microbiology, p. 129-150.

Fikrinda, Anas, I., Purwadaria, T., & Santosa, D.A. (2000). Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil selulase ekstremofilik dari ekosistem air hitam. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 5(2), 48-53.

Ilmen, M., Saloheimo, A., Maija-Leena, O., & Penttila, M.E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental. Microbial.*, 63(4), 1208-

- 1306.
- Kader, A.J., & Omar, O. (1998). Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-Kinabalu Park, Sabah. Serawak. *Journal of Biodiversity and BioConservation* (ARBEC), p. 1-6.
- Kim, S.J., Lee, C.M., Han, B.R., Kim, M.Y., Yeo, Y.S., Yoon, S.H., Koo, B.S., & Jun, H.K. (2008). Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiology*, 282, 44-51.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., & Borchert, S. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256.
- Lednicka, D., Mergaert, J., Cnockaeri, M.C., & Swings, J. (2000). Isolation and identification of cellulolytic bacteria involved in the degradation of natural cellulosic fibres. *System Applied Microbiology Journal*, 23, 292-299.
- Leeson, S., & Zubair, A.K. (2000). Digestion in Poultry II: Carbohydrates, vitamins and mineral. Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph Ontario. Canada, 873 pp.
- Macrae, A. (2000). The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 77-82.
- Madigan, M., & Martinko. (2005). Brock biology of microorganisms (11th Ed.). Prentice Hall, 1136 pp.
- Maki, M., Leung, K.T., & Qin, W. (2009). The prospects of cellulase producing bacteria for the bio-conversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, 5(5), 500-516.
- Manabe, K., Kageyama, Y., Morimoto, T., Shimizu, E., Takashi, H., Kanaya, S., Ara, K., Ozaki, K., & Ogasawara, N. (2013). Improved production of secreted heterologous enzyme in *Bacillus subtilis* strain MGB874 via modification of glutamate metabolism and growth conditions. *Journal of Microbial Cell Factories*, 12(18), 10.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Andrew, J., Weightman, Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., & Wade, W.G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Applied Environmental of Microbiology*, 64(2), 795-799.
- Mawadza, C., Booger, F.C., Zvauya, R., & Verseveld, H.W. (1996). Influence of environmental factors on endo- β 1,4-glucanase production by *Bacillus* HR 68, isolated from a Zimbabwean hot spring. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69(4), 363-369.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analysis of Chemistry*, 31, 426-428.
- Nakano, Michiko, Zuber, M.M., & Peter. (1998). Anaerobic growth of a "Strict Aerobe" (*Bacillus Subtilis*). *Annual Review of Microbiology*, 52, 165-90.
- Narasimhan, A., Bist, D., Suresh, S., & Shivakumar, S. (2013). Optimization of mycolytic enzymes (Chitinase, β -1,3-Glucanase and Cellulase) production by *Bacillus subtilis*, a potensial biocontrol agent using one factor approach. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 72, 172-178.
- Ponnambalam, A.S., Deepthi, R.S., & Ghosh, A.R. (2011). Qualitative display and measurement of enzyme activity of isolated cellulolytic bacteria. *Journal of Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*, 1, 33-37.
- Priest, F.G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in genus *Bacillus*. *American Society for Microbiology*, 41(3), 711-763.
- Rafsanjani, A. (2011). Analisis keragaman genetik ikan mas (*Cyprinus carpio*) di Waduk Saguling dengan menggunakan metode RAPD PCR. Skripsi. Program Studi Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran.
- Rahmadini, I. (2012). Pemurnian dan karakterisasi enzim selulase dari bakteri yang diisolasi dari limbah rumput laut. Tesis. Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor, 82 hlm.
- Rasyid, A. (2005). Beberapa catatan tentang alginat. *Oseana*, 30(1), 9-14.
- Robson, L.M., & Chambliss, G.H. (1989). Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(10), 626-644.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1-17.
- Scholle, M.D., White, C.A., Kunnialaiyaan, M., & Vary, P.S. (2003). Sequencing and characterization of pBM 400 from *Bacillus megaterium* QM B1551. *Applied and Enviromental Microbiology*, 69(11), 6888-6898.
- Schumann, W. (2007). Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Advances in Applied Microbiology*, 62, 137-189.
- Shabeb, M.S.A., Younis, M.A.M., Hezayen, F.F., & Eldein, M.A.N. (2010). Production of cellulase in low-cost medium by *Bacillus subtilis* KO strain. *World Applied Sciences Journal*, 8(1), 35-42.
- Simonen, M., & Palva, I. (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 57, 109-137.
- Sindhu, I., Chibber, S., Capalsh, N., & Sharma, P. (2006). Production of cellulase-free xylanase from *Bacillus megaterium* by solid state fermentation for biobleaching of Pulp. *Current Microbiology*, 53(2),

167-172.

Sukumaran, R., Sing-Hania, R.R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases -production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64, 832-844.

Suwanto, Yogiana, Suryanto, D., Tan, I., & Puspitasari, E. (2000). Selectes protocols training course on

advances in molecular biology techniques to asses microbial diversity. SEAMEO-BIOTROP. Bogor, p. 22-31.

Yamane, K., Bunai, K., & Kakeshita, H. (2004). Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68(10), 2007-2023.